

EUROPEAN PATENT OFFICE

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 08225462
PUBLICATION DATE : 03-09-96

APPLICATION DATE : 30-11-95
APPLICATION NUMBER : 07312562

APPLICANT : TOAGOSEI CO LTD;

INVENTOR : MATSUMOTO TOMOE;

INT.CL. : A61K 39/00 A61K 38/22 A61K 38/22
A61K 38/22 A61K 38/22 // C07K 14/485
C07K 14/515

TITLE : VACCINE

Ala Pro Met Ala Glu Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys
1 5 10 15
Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu
20 25 30
Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr Ile Phe Lys
35 40 45
Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn Asp Gln
50 55 60
Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile
65 70 75 80
Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Glu Met Ser Phe
85 90 95
Leu Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg
100 105 110
Gln Gln Asn Pro Cys Gly Pro Cys Ser
115 120

ABSTRACT : PURPOSE: To provide a vaccine which contains a cell growth factor having cell growth activity specific to vascular endothelial cells and is useful in prophylaxis and remedy to diseases caused by neo-vascularization, particularly showing prophylactic and remedial effect on cancer occurrence.

CONSTITUTION: This vaccine has a cell growth factor having a cell growth actively specific to vascular endothelial cells or a fragment thereof. As the cell growth factor described above, are cited preferably vascular endothelial cell growth factor/vascular permeation factor (VEGF/VPF). This vaccine is prepared, for example, by using as an adjuvant the Freund's complete adjuvant to the human VEGF/VPF 121 having the amino acid sequence shown in the formula, expressed in insect cells using Baculovirus vector.

COPYRIGHT: (C)1996,JPO

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-225462

(43)公開日 平成8年(1996)9月3日

| (51)Int.Cl. ⁶ | 識別記号 | 序内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
|--------------------------|------|----------|----------------|--------|
| A 6 1 K 39/00 | ADU | | A 6 1 K 39/00 | ADUH |
| 38/22 | ABG | 8517-4H | C 0 7 K 14/485 | |
| | ABL | 8517-4II | 14/515 | |
| | ABN | | A 6 1 K 37/24 | ABG |
| | ABX | | | ABL |

審査請求 未請求 請求項の数3 ○L (全7頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平7-312562

(22)出願日 平成7年(1995)11月30日

(31)優先権主張番号 特願平6-298718

(32)優先日 平6(1994)12月1日

(33)優先権主張国 日本 (JP)

(71)出願人 000003034

東亞合成株式会社

東京都港区西新橋1丁目14番1号

(72)発明者 戸井 雅和

東京都板橋区成増3-37-1-202

(72)発明者 近藤 伸一

茨城県つくば市大久保2番 東亞合成株式会社つくば研究所内

(72)発明者 松本 友恵

茨城県つくば市大久保2番 東亞合成株式会社つくば研究所内

(74)代理人 弁理士 平木 祐輔 (外1名)

(54)【発明の名称】ワクチン

(57)【要約】

【構成】 血管内皮細胞に対する特異的細胞増殖促進活性を有する細胞増殖因子又はその断片を含む血管新生に起因する疾患の治療もしくは予防用ワクチン。

【効果】 本発明のワクチンは、血管新生に起因する疾患の発症抑制効果並びに治療効果を個体に付与することができる。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 血管内皮細胞に対する特異的細胞増殖促進活性を有する細胞増殖因子又はその断片を含む血管新生に起因する疾患の治療もしくは予防用ワクチン。

【請求項2】 細胞増殖因子が血管内皮細胞増殖因子である請求項1記載のワクチン。

【請求項3】 血管新生に起因する疾患が癌である請求項1又は2記載のワクチン。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、血管新生に起因する疾患に対するワクチン、特に癌ワクチンに関わるものであり、より詳しくは血管内皮細胞に対する特異的細胞増殖促進活性を有する細胞増殖因子、特に血管内皮細胞増殖因子を主要抗原成分とした免疫療法剤に関わるものであり、固形癌を初めとする各種疾患の治療、発症(再発を含む)抑止等の目的に使用されるものである。

【0002】

【従来の技術】高等動物においては、抗原と称される物質が生体内に入り込んできた場合に抗体と呼ばれる物質を生成する能力が備わっていることが知られている。この目的は自己に害を及ぼす恐れのある物質又は生物、即ち抗原から生体を保護することにある。これは侵入した抗原を特異的に認識し、その抗原を分解、中和、不活性化することによって生体を保護しようとするものである。

【0003】近年の免疫学の著しい進歩によって、侵入してきたあらゆる種類の抗原に対していかに巧妙に特異抗体が生成され、種々の免疫担当細胞が動員され、目的を達するのか、といふいわゆる免疫応答の仕組みが次々に明らかにされてきており、その仕組みの巧妙さ及び複雑さには目を見張るものがある。それらについては、例えば、「免疫学」(小山次郎、大沢利昭編集、南江堂発行)等に詳細に説明されている。

【0004】免疫応答機構の最も驚嘆すべき点の一つに、一度侵入した抗原を記憶し、再度同じ抗原が侵入した場合に極めて迅速、有効に免疫応答を誘起するという性質がある。この性質を利用したもので、すでに人類の福祉に貢献している技術がワクチン又は予防接種と呼ばれるものである。旧来、ヒトは一度感染した疫病には二度かかりにくいということが経験的に認知されていたが、これを医療行為に役立てたジェンナーの種痘は、あまりにも有名な出来事である。

【0005】以降ワクチン接種、予防接種は様々な応用をみることになり、予防医学上極めて有効な手立てとして現在も広く行われている。この技術は、不活性化した感染性生物又は感染性生物の構成物質の一部を予めヒトに接種し擬似感染を成立させることによって、本当の感染時に生体内に記憶された免疫応答を有効に引き出し感染症に対する耐性を発揮させるというものである。

2

【0006】以上述べてきたようにワクチン技術は感染症分野での極めて有効な手法として発達してきている。さらに近年の研究の成果により、免疫応答機構は生体内に生ずる各種新生物生成疾患即ち癌の発症に於いても重要な役割を担っているのではないかと考えられるようになってきた。即ちある種の免疫担当細胞は常に生体の全ての細胞と物体とを監視し非自己と判断された細胞を排除する機能を担っており、形質転換を起こした細胞即ち腫瘍細胞の発生もこれら監視機構によって常時チェック

10 されており、発生した腫瘍細胞の多くは悪性な癌となる以前に排除されているのではないかという考えがあり、この機構は癌細胞を傷害するキラーT細胞はじめ単核食細胞マクロファージ、好中球、NK細胞などが司る主に細胞性免疫と呼ばれるしくみによって成り立っていることが明らかとなってきた。

【0007】これらの知見からさらに一步進めて癌免疫を積極的に治療に応用しようという癌免疫療法という考えが提唱されるに至った。その中身としては、上に述べた感染症に対するワクチンと原理的に共通な能動免疫療法、即ち不活性させた癌細胞やその成分を接種することによって抗癌効果を引き出そうというものや、免疫賦活療法、即ち免疫応答機構そのものを非特異的に活性化させて抗癌免疫効果を高めよう、といったものがあげられる。

【0008】ここに述べたような癌抗原と免疫機構を応用した癌免疫療法は癌治療の新しい試みとして研究されているが、多くの場合癌抗原は各々の癌細胞に特有のものであることや必ずしも全ての癌の系で発現しているとは限らない点、さらには感染症に対する免疫反応のような強い効果が得られないことや、癌細胞自体が癌免疫の成立を逃れる機構を有している場合があることなどの問題点を有しており、一般的な療法としての有用性は今後の進展を待たねば結論できないものである。

【0009】腫瘍の治療法として現在広く用いられているものの多くは、化学療法であれ、放射線療法であれ上述の癌免疫療法であれ腫瘍細胞そのものをターゲットとしたものがほとんどである。薬剤の投与による腫瘍に対する選択的攻撃は、腫瘍細胞が他の正常な細胞に比べてはるかに活発に分裂、増殖を繰り返しているという性状に依るところが大きい。即ち細胞の増殖機構そのものを破壊、ないしは阻害することによって標的細胞を殺すという目的を達成するものである。

【0010】一方、固形腫瘍の増殖を抑制する方法に、その栄養ならびに酸素の供給源を断つ、いわゆる兵糧責めのアイディアが提唱されてきた。即ち腫瘍細胞そのものを攻撃することなく、栄養や酸素の枯渇状態におとし、結果として腫瘍の増殖抑止、そして退縮という治療効果をあげるというものである。この手法の具体的な標的として、腫瘍に到達している血管があげられる。

【0011】一般に細胞が悪性転化し癌細胞が発生した

としても、その増殖は初期においては非常にゆっくりしたものであると言わわれている。報告によると発生した腫瘍は血管の到達無しには直径2mm以上には増殖しないとさえ言われている (M. A. Gimbrone et al., J. Exp. Med. 136, 261, 1972)。ところがこの病変部位にひとたび血管が到達すると、無尽蔵な栄養と酸素の供給を得た腫瘍は爆発的に増殖を開始するのみならず、その血管を介して遠隔転移なども起こすことになる。このことが血管新生は腫瘍の進行、転移と切っても切れない関係にあると言われる由縁である。癌細胞が発生するとそれに向かって周囲の血管から新たに分岐した新生血管が癌細胞に向かって遊走することが観察されており、この現象から癌細胞は血管の新生、遊走を誘起するなんらかの因子を出しているのではないかと考えられるようになり、癌血管新生因子 (Tumor Angiogenesis Factor:TAF) の存在が提唱されてきた (J. Folkman, Cancer Research 46, 467, 1986)。

【0012】一方、血管の新生を誘起する、あるいは血管の構成細胞である血管内皮細胞の増殖を促進させる物質として、酸性線維芽細胞増殖因子 (acidic fibroblast growth factor:aFGF), 塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor:bFGF), 上皮増殖因子 (Epidermal growth factor:EGF), 血小板由来内皮細胞増殖因子 (platelet-derived endothelial cell growth factor:PD-ECGF), 血管内皮細胞増殖因子/血管透過性因子 (vascular endothelial cell growth factor/vascular permeability:VEGF/VPF), 胎盤由来増殖因子 (Plasenta growth factor:PIGF) 等多くの物質が報告されているが (reviewed R. Bicknell and A.L. Harris, Eur. J. Cancer 27, 6, 781, 1991)、これらのどの物質がどの様な機作で前述のTAFの作用を担っているのかは判ってはない。本発明者らは、これら因子の中でVEGF/VPFが細胞内分泌に係わるシグナルペプチドを有すること、ならびにテストしたほとんど全ての癌細胞で発現が見られることに注目し、VEGF/VPFが腫瘍血管新生になんらかの係わりがあるのではないかという仮説をたてて研究を行った。その結果VEGF/VPFの作用は腫瘍細胞そのものに対してではなく血管内皮細胞特異的に発揮され、生体内では血管の新生を促すことがわかった。さらにはこのVEGF/VPFの作用を抗VEGF/VPFポリクローナル抗体で抑制することによって生体内での腫瘍の増殖を抑えることが出来ることを見いだした (S. Kondo et al., Biochemical and Biophysical Research Communications 194, 1234, 1993)。又、それに先だって米国のKimらは、抗VEGF/VPF中和モノクローナル抗体によって生体内での腫瘍の増殖を抑制することができることを示した (K. J. Kim et al., Nature 362, 841, 1993)。これらの結果はVEGF/VPFと特異的に結合しその働きを妨害する、いわゆる液性免疫成分である抗体を生体内に投与する事によって腫瘍の増殖を抑制できることを示したものである。

【0013】そこで本発明者らは、ウサギやマウスを免疫する事によって得た抗VEGF/VPF抗体を他の個体に投与することによって抗腫瘍性が得られるのであれば、腫瘍を発生する個体そのものの免疫系をVEGF/VPFを抗原として刺激することによって、当該個体由来の抗VEGF/VPF抗体を生成させ、結果として当該個体に抗腫瘍性を付与できるのではないかと考え研究を行ったのである。

【0014】

【発明が解決しようとする課題】即ち、本発明者らは、
10 生体に備わった免疫応答機構をより広く癌の治療に応用するべく、固形癌の増殖、浸潤、転移に深く関与するされる腫瘍血管の新生機構に着目しワクチンについての研究を行い、各種の疾患に適用できる本発明を完成したのである。

【0015】

【課題を解決するための手段】本発明は、血管内皮細胞に対する特異的細胞増殖促進活性を有する細胞増殖因子又はその断片を含む血管新生に起因する疾患の治療もしくは予防用ワクチンに関するものである。上記細胞増殖因子としては血管内皮細胞増殖因子又は血管透過性因子と呼称されている因子が、又、血管新生に起因する疾患としては癌が特に有効なものとして挙げられる。なお、以下、血管透過性因子 (Vascular Permeability Factor) は VPF と、血管内皮細胞増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor) は VGEF と、それぞれ略す。

【0016】

【発明の実施の形態】本発明のワクチンは、血管新生が関与する疾病を治療及び予防すること、特に固形腫瘍の発症抑止効果並びに抗腫瘍効果を個体に付与することができるものである。本発明における血管内皮細胞に対する特異的細胞増殖促進活性を有する細胞増殖因子としては、前記した下記のものが例として挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0017】即ち、酸性線維芽細胞増殖因子 (acidic fibroblast growth factor:aFGF), 塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor:bFGF), 上皮増殖因子 (Epidermal growth factor:EGF), 血小板由来内皮細胞増殖因子 (platelet-derived endothelial cell growth factor:PD-ECGF), 血管内皮細胞増殖因子/血管透過性因子 (vascular endothelial cell growth factor/vascular permeability:VEGF/VPF), 胎盤由来増殖因子 (Plasenta growth factor:PIGF) 等である。

【0018】又、それらの断片としては、それぞれの因子のポリペプチドから誘導されるものや化学合成によって作成された当該因子のアミノ酸配列の一部を含む合成ペプチドであって、当該因子に対する免疫抗体を作らし得るものが挙げられる。なお、血管内皮細胞に対する特異的細胞増殖促進活性を有する細胞増殖因子の一つであるVEGFのエピトープに相当するペプチドの一部 (例えば、TryProAspGluIleGluTryIlePheLysのアミノ酸配列を

有するペプチド)は既に本発明者らによって見いだされ、特願平6-125569号等に記載されている。

【0019】これらの中でも、特にVEGF/VPPは腫瘍血管新生に於いて主要な役割を担う因子であり、かつ多くの腫瘍細胞によって分泌されていると考えられるようになってきたものであり、VEGF/VPPを抗原とするワクチンは固形癌一般に対してその増殖、転移を抑制する効果が期待できる免疫療法薬剤である。さらに、VEGF/VPPを抗原としてワクチン接種を行うことの優位性としては以下のようなことが挙げられる。

【0020】先ず第一に、前記したように腫瘍の発生には血管新生が必須であると考えられており、血管新生無しには腫瘍増殖は極めて緩慢であり、かつ生育する大きさにも上限があるという点にある。即ち固形癌発症の必須項目である腫瘍血管新生を予め個体をVEGF/VPPで免疫しておくことによって完全に止めるまでもなく遅れさせることができ、結果として発生した腫瘍細胞が死滅することができないにせよ疾病としての癌発症と認識されるまでには膨大な時間が稼げることになる。例えば、生体内のある細胞が形質転換を起こし、突然変異を起こしながら分裂を続け、最終的に血管の新生を伴った癌という疾病に進展するのに数年から数十年の時間を要するとされているが、この期間を数倍に伸ばすことができれば、細胞変異の発生から疾病としての癌成立までにヒトの寿命に對してかなりの期間がかかることになり、特殊な例を除いて癌発症が中高年に集中していることを考えれば、この期間の意味は極めて大きく、本発明によれば、病気としての癌に有効であるために完璧な作用を要さないということになり、他の療法に比べて寛容度の大きいものとなるのである。

【0021】第二に、上に述べた発症抑止効果に加えて、癌の退縮効果をも期待できる点である。実験的に担癌動物に抗VEGF/VPP抗体を投与することによって得られる効果の大部分は、抗体投与によってVEGF/VPP活性が中和されることによるものであると考えられ、この様な効果は生体内での投与抗体の存在量に依存しており、多くの場合蛋白性の高分子の生体内半減期は短いことから、一過性のものであると考えられる。従って抗体投与による治療にはしばしば反復投与が行われている。

【0022】一方本発明による場合は理論的に抗体は生体内で供給されることからその効果は持続性であると考えられ、VEGF/VPPの中和効果は継続して発揮されることが期待できるものである。さらに、本発明によればワクチン接種された個体に抗原刺激に対する一連の免疫応答がもれなく備わっていることが予想され、抗体によるVEGF/VPP活性の中和効果にとどまらず、細胞性免疫機構から補体活性化機構までを含んだ免疫応答が抗原提示細胞に対して発動されることが期待される。生体内で腫瘍が増殖する状況でVEGF/VPP抗原を提示する細胞としては、種々の免疫組織染色の結果から、VEGF/VPPを產生する腫

瘍細胞そのものに加え、VEGF/VPPを細胞表面受容体に結合させた腫瘍血管の内皮細胞が知られている。すなわち腫瘍免疫の攻撃対象として、腫瘍細胞そのもの、さらにはその腫瘍に酸素や栄養素を供給している腫瘍血管細胞が考えられることになる。これらの結果として腫瘍血管の新生抑止作用に加えて、既に形成されている腫瘍そのものやその腫瘍血管を直接の標的とする腫瘍壊死効果も得られることが期待される。

【0023】本発明のワクチンは、固形腫瘍以外の血管新生が関与する疾病も治療及び予防することができるものである。例えば、アテローム性動脈硬化病の血管新生をこのワクチンにより抑制し、治療することができる。又、高脂血症の人に投与することによりアテローム性動脈硬化病の発症を抑制することができ、心筋梗塞や脳梗塞の発病を予防することができる。さらに、慢性関節リウマチは関節内に血管が新生することにより発症する疾患であり、この患者は、この血管新生が進むことにより憎悪するのであるが、慢性関節リウマチの患者にこのワクチンを投与することにより、症状の憎悪を抑制することが期待できるうえ、慢性関節リウマチの発症の原因も血管新生と考えられるため治療にもつながるものと期待される。又、糖尿病患者に対して、このワクチンを投与すると、糖尿病性網膜病や腎症の発症を抑制することができる。即ち、糖尿病性網膜病にVPPが関与していることが報告されており、VPPをワクチンにより除くことにより発症を抑制することができる。

【0024】その他、血管新生が関与する疾病として網膜中心静脈閉塞症、後水晶体線維増殖症、緑内障、老人性円板状黄斑変性症、眼腫瘍、トラコーマ、未熟兒網膜症、角膜移植に伴う血管新生、乾せん、化膿性肉芽腫瘍、血管腫、肥大性はん疽、肉芽及び浮腫性硬化症等が挙げられ、このワクチンはこれらの疾病の治療及び予防が期待できる。

【0025】

【実施例】以下にパキュロウイルスベクターを用いて昆虫細胞で発現させたヒトVEGF/VPP121を抗原に、フロイントのコンプリートアジュバントをアジュバントとして用いた実施例を述べるが、本発明は、抗原、アジュバントにこの様なものを用いた場合に限定されるものではない。例えば、VEGF/VPP抗原としてはヒト以外の動物種由来のVEGF/VPP、ヒト由来であっても121アミノ酸残基数以外の長さのVEGF/VPP、上記方法以外の方法で調製した各種VEGF/VPP、さらには化学合成によって作成されたVEGF/VPPアミノ酸配列の一部を含む合成ペプチドで免疫抗体を作らし得るものが含まれる。なお、ヒトVEGF/VPP121は配列番号1のアミノ酸配列を有するポリペプチドである。

【0026】アジュバントとしては百日咳菌ワクチン、溶連菌製剤、内毒素リポ多糖体、BCG、水酸化アルミニウム等があげられる。又、生体内での抗原性の増強の

ためにVEGF/VPPを熱や酸などによって変性させたもの、あるいはVEGF/VPPを他の蛋白や高分子物質と結合させたもの、さらには他の蛋白と融合させたキメラ蛋白なども用いられる。

【0027】〔実施例1〕ワクチン接種したマウスへの癌移植実験

本発明ワクチンの腫瘍増殖抑制への効果を見るために、マウス(C57BL/6)にワクチン接種を行い、抗VEGF/VPP抗体値の上昇を確認した後にマウスルイス肺癌(LLC)を移植し、ワクチン接種群と非接種群とでLLCの増殖を比較した。

【0028】ワクチン接種

8週令の雄マウス(C57BL/6)5匹に、初回(0週)は0.02mg/mouseのVEGF/VPPを0.1mlのフロイントのコンプリートアジュバント[Freund's complete adjuvant (DIFCO製)]と共に全容量0.2mlにて腹腔内に、2回目(1週)と3回目(2週)は0.02mg/mouseのVEGF/VPPを0.1mlのフロイントのインコンプリートアジュバント[Freund's incomplete adjuvant (DIFCO製)]と共に全容量0.2mlにて腹腔内に、それぞれ投与した(ワクチン接種群)。対照として初回(0週)にフロイントのインコンプリートアジュバント0.1mlを水と共に全容量0.2mlにて腹腔内に、2回目(1週)と3回目(2週)はフロイントのインコンプリートアジュバントを水と共に全容量0.2mlにて腹腔内に投与した群(アジュバント対照群)、とリン酸緩衝液生理食塩水(PBS)0.2mlのみを初回(0週)、2回目(1週)と3回目(2週)に腹腔内に投与した群(バッファー対照群)とを準備した。

【0029】抗体値の推移

ワクチンを接種することによって未梢血中の抗VEGF/VPP抗体値が上昇しているかどうか(抗体陽性化:すなわちワクチンによる陽転)を調べる目的で、それぞれの群の各個体から0、1、2、3、5、7、9週に部分採血を行い、血中の抗VEGF/VPP抗体値を調べた。すなわち採取した未梢血を直ちに遠心分離し血漿を得、血漿を0.1%BSA-PBS(0.1%ウシ血清アルブミン含有リン酸緩衝液生理食塩水)で1000倍に希釈し、VEGF/VPP蛋白を固定化してある樹脂イムノアッセイプレートに0.1mlずつ分注し、固定化してあるVEGF/VPP蛋白に抗VEGF/VPP抗体を特異的に結合させた。結合した抗VEGF/VPP抗体量を予め酵素標識した抗マウスIgG抗体を使って検出した(いわゆる広く行われている酵素免疫測定法によった)。かかる方法によって調べられた各マウスの血中抗VEGF/VPP抗体値の平均値の推移を図1に示す。すなわち、図1はワクチン接種したマウスへの癌移植実験に於けるマウス血中抗VEGF/VPP抗体値の平均値の推移をワクチン接種群(●)、アジュバント対照群(○)、バッファー対照群(△)それぞれについてプロットしたグラフを示すものである。この図からワクチン接種群では7週目を頂点とした顕著な抗体値の上昇が観察され、一方バッファー対照群では

全ての期間に渡って全く変化は観察されなかった。アジュバント対照群では7、9週目に緩やかな抗体値の上昇が観察されたが、これはフロイントのアジュバントの備え持つ性質である免疫反応の非特異的活性化の影響であろうと考えられた。

【0030】 固形癌移植と増殖の追跡

未梢血中の抗体値は第7週目に頂点を越えたと考えられたため、9週目にLLC固形癌の移植を行い、以降癌の増殖を追跡した。予め別のマウスの中で十分に生育させておいたLLC固形癌を3×3×3mmの大きさに切り揃え、1群5匹のワクチン接種群、アジュバント対照群、バッファー対照群のマウス皮下に移植した。

【0031】癌の増殖は移植後6、9、13日目に測定し、腫瘍容積=短径×短径×長径÷2の計算方法で求めた。それぞれの群における癌の増殖の平均値の推移を図2に示す。すなわち、図2はワクチン接種したマウスへの癌移植実験に於ける癌の増殖の平均値の推移をワクチン接種群(●)、アジュバント対照群(○)、バッファー対照群(△)それぞれについてプロットしたグラフである。この図からワクチン接種群では他の群に比べて顕著な増殖の抑制が観察された。

【0032】統計解析

観察されたワクチン接種群における増殖抑制が統計学上有意な差であるのかどうかをスチューデントのT-テスト(Student's t-test)にて検定した。その結果6、9、13日目何れの時点においてもワクチン接種群はバッファー対照群、アジュバント対照群いずれに対しても有意に増殖が抑制されている状態であるという結果となった($p < 0.05$:有意)。バッファー対照群とアジュバント対照群との比較では、アジュバント対照群の方が若干増殖が遅いように見受けられたが、統計学上の有意差は見い出されなかった。以上の研究結果から、本発明すなわちVEGF/VPPを主成分とする癌ワクチンはマウスにおける固形癌移植のモデル系においてその有効性を示すことが明らかとなった。

【0033】〔実施例2〕ワクチン接種したマウスへの癌転移実験

本発明ワクチンの腫瘍転移抑制への効果を見るために、マウス(C57BL/6)にワクチン接種を行い、抗VEGF/VPP抗体値の上昇を確認した後にマウス固形癌(B16F1)を尾静脈より接種し、ワクチン接種群と非接種群とで肺に形成された転移巣の数を比較した。

【0034】ワクチン接種

8週令の雄マウス(C57BL/6)10匹に実施例1と同様にワクチン接種を行い、対照も同様に、アジュバント対照群とバッファー対照群とを準備した。

【0035】抗体値の推移

ワクチン接種マウスの抗体値の推移が実施例1と同様であるかを確認するため、5週(抗体値の顕著な上昇が観察された時点)と9週(抗体値の低下が観察された時

点)に部分採血を行い、実施例1に示した方法で血中の抗VEGF/VPP抗体値を調べた。各マウスの血中の抗VEGF/VPP抗体値の平均値の推移を図3に示す。すなわち、図3はワクチン接種したマウスへの癌転移実験に於けるマウス血中抗VEGF/VPP抗体値の平均値の推移をワクチン接種群(■)、アジュバント対照群(●)、バッファー対照群(△)それぞれについてプロットしたグラフである。この図から、ワクチン接種群の抗体値は5週目では著しい上昇が、9週目には低下が観察され、ワクチン接種マウスの抗体値の推移は実施例1と同様であることが確認された。

【0036】 固形癌細胞の接種と転移巣数

9週目に、DMEM 10%FBSを用いて培養したB16F1細胞を 5×10^6 個/mlになるよう調製し、これを0.2mlずつ(1×10^6 個/マウス)、1群10匹のワクチン接種群、アジュバント対照群、バッファー対照群のマウスの尾静脈より血管内投与を行い、11週目に肺への生着コロニー数を測定した。それぞれの群における生着コロニー数の平均値を図4に示す。すなわち、この図はワクチン接種したマウスへの癌転移実験に於ける癌の生着コロニー数の平均値をワクチン接種群、アジュバント対照群、バッファー対照群それぞれについてプロットしたグラフである。この図からワクチン接種群では他の群に比べて頗著な転移抑制効果が観察された。

【0037】 統計解析

観察されたワクチン接種群における癌の転移抑制効果が統計上有意な差であるのかどうかをスチュードントのT-テストにて検定した。その結果、ワクチン接種群はアジュバント対照群、バッファー対照群いずれに対しても有意に転移が抑制されていることが解った(アジュバント対照群 $p < 0.05$; 有意、バッファー対照群 $p < 0.001$; 有意)。アジュバント対照群とバッファー対照群との比較では、アジュバント対照群の方が若干転移巣が少ないよう見受けられたが、統計学上の有意差は見い出されなかつた。

配列:

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Pro | Met | Ala | Glu | Gly | Gly | Gly | Gln | Asn | His | His | Glu | Val | Val | Lys |
| 1 | | | | 5 | | | | | | 10 | | | 15 | | |
| Phe | Met | Asp | Val | Tyr | Gln | Arg | Ser | Tyr | Cys | His | Pro | Ile | Glu | Thr | Leu |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Val | Asp | Ile | Phe | Gln | Glu | Tyr | Pro | Asp | Glu | Ile | Glu | Tyr | Ile | Phe | Lys |
| | | | 35 | | | | 40 | | | 45 | | | | | |
| Pro | Ser | Cys | Val | Pro | Leu | Met | Arg | Cys | Gly | Gly | Cys | Cys | Asn | Asp | Glu |
| | | | 50 | | | 55 | | | 60 | | | | | | |
| Gly | Leu | Glu | Cys | Val | Pro | Thr | Glu | Glu | Ser | Asn | Ile | Thr | Met | Gln | Ile |
| | | | 65 | | | 70 | | | 75 | | | 80 | | | |
| Met | Arg | Ile | Lys | Pro | His | Gln | Gly | Gln | His | Ile | Gly | Glu | Met | Ser | Phe |
| | | | 85 | | | | 90 | | | 95 | | | | | |
| Leu | Gln | His | Asn | Lys | Cys | Glu | Cys | Arg | Pro | Lys | Lys | Asp | Arg | Ala | Arg |
| | | | 100 | | | | 105 | | | 110 | | | | | |

【0038】

【発明の効果】本発明のワクチン、特にVEGF/VPPを含むワクチンを生体に接種することにより生体そのものを持つ免疫応答を引き出し、その結果VEGF/VPPが重要な役割を果たしていると考えられている腫瘍増殖に於ける血管新生を抑制し、腫瘍や腫瘍血管を攻撃し、抗腫瘍効果が得られるものであり、さらに、以下のような効果も期待できる。

【0039】 1. 個体に予めVEGF/VPPを含むワクチンを接種しておくことによって、自然発生的に生成していく腫瘍を大きくさせない、腫瘍の顕在化を著しく遅延させるという、疾病としての癌発症の予防効果が期待できる。

2. 癌転移は原発性の癌由来の癌細胞が異所に於いて増殖することによって成立する。この場合にも移転成立、すなわち異所での癌細胞増殖、のカギを握っているものが、血管新生であると考えられ、外科的に癌を切除の前に、VEGF/VPPを含むワクチン接種を行っておくことによって、原発性の癌の場合と同様に異所に於いて生成していく癌腫を大きくさせない、癌腫の顕在化を著しく遅延させるという、癌転移の予防効果が期待できる。

【0040】 3. 癌細胞の多くはVEGF/VPPを生成し、腫瘍血管の内皮細胞上に近傍の癌から分泌されたと思われるVEGF/VPPの蓄積が観察されることが知られており、これら癌細胞そのものや腫瘍血管内皮細胞が細胞障害性免疫応答の標的となりうる。そこで既に腫瘍血管の新生を伴う固形癌の治療にも、癌免疫療法の一つとして本ワクチン接種が有効であると期待できる。

【0041】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 121

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: タンパク質

11

12

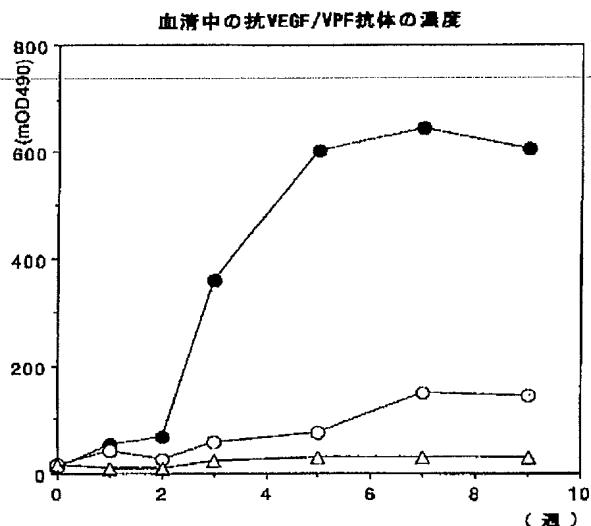
Gln Glu Asn Pro Cys Gly Pro Cys Ser
115 120

【図面の簡単な説明】

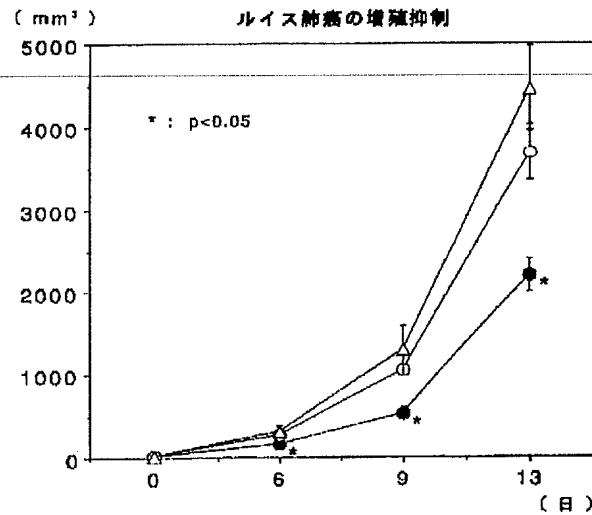
【図1】マウス血中抗VEGF/VPF抗体値の平均値の推移を示す図である。

【図2】癌の増殖の平均値の推移を示す図である。

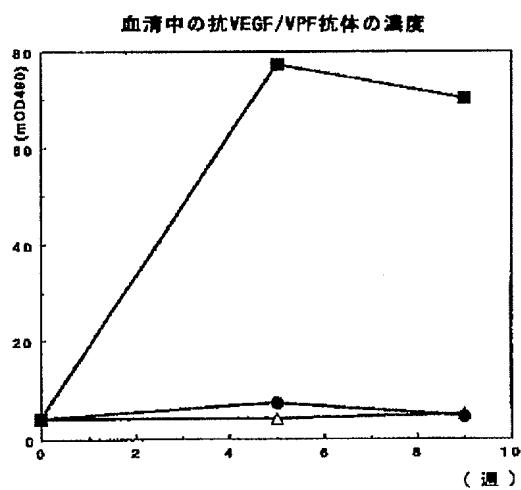
【図1】



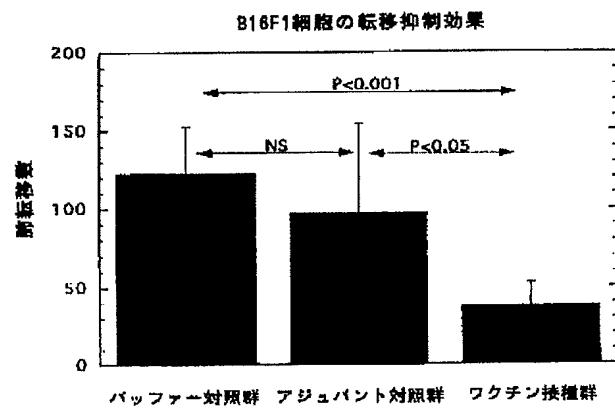
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(51) Int.Cl. 6
// C 07 K 14/485
14/515

識別記号 庁内整理番号

F I
A 61 K 37/24

技術表示箇所

ABN
ABX